

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
総括研究報告書

先天性GPI欠損症の症例登録システムの構築と実態調査及び早期診断法の確立

研究代表者 村上良子 大阪大学微生物病研究所 寄附研究部門教授

研究要旨

先天性 GPI 欠損症 (IGD) は GPI アンカーの生合成遺伝子群の変異により重要な機能を担う GPI アンカー型蛋白質 (GPI-AP) の発現が低下し精神・運動発達遅滞やてんかん、奇形等の症状を来す。今年度新規に 3 遺伝子の欠損症が見つかり現在 18 種類の遺伝子変異による先天性 GPI 欠損症 (IGD) が報告されている。国内で 30 例、海外を合わせると約 200 例の報告があり、その多くに我々が関わっている。生後も病態が進行する症例もあるので効率的なスクリーニング体制を構築し、早期に的確に診断し、痙攣に有効とされているピリドキシリン投与などの早期治療を行うことが患者の QOL を改善することがわかってきた。Mabry 病が IGD であることが明らかになったがさらに横隔膜ヘルニアに手指・足趾の末節骨や爪の欠損を伴う Fryns syndrome が、PIGN, PIGV 欠損症であることがわかり IGD の最重症型であると考えられる。一方では FACS で GPI-AP の発現低下を呈し IGD と診断した症例のなかに GPI 遺伝子以外を責任遺伝子とする症例が複数例見つかり IGD との関連を解析している。平成 29 年度より指定難病、平成 30 年度より小児慢性特定疾病に認定された。28 年度は研究室内での FACS 解析の標準化と業者委託の準備、29 年度には SRL 社と FACS 解析について委託研究の契約書を交わして研究を開始し、検査の標準化を行った。

研究分担者

井上徳光 独立行政法人大阪府立病院機構大阪
国際がんセンター研究所・腫瘍免疫学部門長
高橋幸利 独立行政法人国立病院機構静岡てん
かん・神経医療センター 副院長

A. 研究目的

GPI (Glycosylphosphatidylinositol) アンカーは 150 種以上の蛋白質を細胞膜につなぐ糖脂質でその生合成に 27 個の遺伝子が関与する。これら GPI 遺伝子群の変異により重要な機能を担う GPI アンカー型蛋白質 (GPI-AP) の発現が低下し精神・運動発達遅滞やてんかん、奇形等の症状を来す先天性 GPI 欠損症 (IGD) となる。今年度新規に 3 遺伝子の欠損症が見つかり現在 18 種類

の遺伝子変異による先天性 GPI 欠損症 (IGD) が報告されている。責任遺伝子が今後も拡大する可能性があり他疾患と診断されたものも病態から IGD に分類されるものがあると予想される。IGD は症状が多彩なのでベッドサイドでの診断が難しい。さらに生後も病態が進行する症例もあるので早期診断が必要である。疾患登録を推進して多症例の臨床像・検査所見を詳細に解析し、より鋭敏な疾患マーカーを見つけそれらを診療ガイドラインに反映させ、より早期の正確な診断を目指す。

B. 研究方法

(1) 効率的なスクリーニング体制の構築と疾患登録の運用
精神発達障害、てんかんと特徴的な奇形や高 ALP

血症を伴う患者の末梢血を正常コントロール血とともに送付してもらい、フローサイトメトリ検査で顆粒球における GPI アンカー型タンパク質の発現を確認する。CD16b の発現低下が見られれば、IGD の診断は確定する。責任遺伝子同定の為に末梢血から抽出したゲノムを用いて GPI 関連遺伝子のターゲットエクソームシーケンスを行う。FACS で低下の見られない症例、あるいはターゲットシーケンスで責任遺伝子が同定できない場合は横浜市立大学の遺伝子解析拠点班と連携して全エクソームシーケンスを行った。今年度は阪大で 27 人の検体を FACS 解析し、そのうち 5 例で CD16b の低下を認めた。遺伝子解析により PIGO 欠損症、PIGT 欠損症の新規例を診断しえた。他の症例は全エクソーム解析中である。さらに大阪大学未来医療開発センターと共同して、米国 Vanderbilt 大学が開発したデータ集積管理システム REDCap を使ったデータベースを作成したのでの患者登録を進めている。

(2) FACS 検査の業者委託と標準化

平成 29 年度より指定難病、30 年度より小児慢性特定疾病に認定された。スクリーニングに用いる顆粒球の FACS 解析をベッドサイドで行えるよう SRL 社に委託し、患者検体のみで判定できるようにカットオフ値を設定する試験運用を施行した。

(3) 疾患マーカーの検索

マーカーとなりうる血清 GPI-AP としては、アルカリホスファターゼ (ALP) が知られているが、先天性 GPI 欠損症全例で ALP が上昇する訳ではなく、時期変動も大きく、小児期では対照でも比較的高値のため、感度・特異度が低い。IGD ではアルカリホスファターゼの発現低下に由来する、ビタミン B6 の取り込み低下による代謝異常が起きていると考えられ、その測定システムを確立した。

(倫理面への配慮)

診断に遺伝子解析を伴うので、大阪大学におけるヒトゲノム倫理委員会に申請し承認されている。遺伝子診断に伴う利益、不利益などにつき書面提示し、患者の保護者に対して説明し同意を得た。また、診断や結果に対して、不安が生じた場合は、遺伝カウンセリングを提供できる体制を整えており、いつでも相談できる旨を併せて説明した。

C. 研究結果

(1) 効率的なスクリーニング体制の構築と疾患登録の運用

今年度は国内から 27 例のフローサイトメトリ解析を行い、5 人で CD16 の明らかな低下を認め、IGD と診断した。うち 2 人が遺伝子解析により責任遺伝子が同定でき、他の症例については現在横浜市立大学にて全エクソーム解析を施行中であるが、まだ責任遺伝子が判明していない。また海外との共同研究により世界で初めて PIGP 欠損症、PIGH 欠損症、GPAA1 欠損症を報告した。また最近では GPI pathway 以外の遺伝子変異による IGD も見つかっており、他の疾患とオーバーラップする症例も今後見つかると思われる。IGD と判明している Mabry 病に加え横隔膜ヘルニアに手指・足趾の末節骨や爪の欠損を伴う Fryns syndrome が、PIGN, PIGV 欠損症であることがわかり IGD の最重症型であると考えられる。一方では FACS で GPI-AP の発現低下を呈し IGD と診断した症例のなかに GPI 遺伝子以外を責任遺伝子とする症例が複数例見つかっており IGD との関連を解析している。疾患登録により多くの症例を集積してその特徴を詳細に観察することが重要である。

(4) FACS 検査の業者委託と標準化

SRL 社と委託契約を結び、プロトコルを作成して、患者検体のみでの CD16 の発現量でカットオフ

値を決め、病的な低下を判定するシステムを構築した。岡山大学小児神経科、静岡てんかん・神経医療センター、小児総合医療センター、大阪大学小児科、母子保健センターの協力を得て以下のカテゴリーに合致する症例について SRL 社による CD16 の発現解析を施行した。

必須条件 中等度以上の知的障害（と主治医が主観的に感じている人）

条件 1 明らかな他の原疾患がない難治性てんかん

条件 2 体幹低緊張

条件 3 多発奇形（口唇口蓋裂、Hirschsprung 病、鎖肛、腎奇形、尿路奇形、股関節脱臼）

条件 1 - 3 は、重複していればなお良いですが、1 つだけでも良い。

コントロール検体 46、患者検体 52 例で CD16 の平均蛍光強度 40000 以下の 5 人を暫定的に IGD 疑いとした。集積した結果をもとに統計処理を行いカットオフ値を求めると同時に多施設間での検査の標準化も予定している。

(3) 疾患マーカーの検索

まずヒト神経細胞を使ったビタミン B6 誘導体濃度の測定系を北海道医療大学との共同研究で確立したので、今後この系を利用して最も鋭敏なマーカーを検索する予定である。

D . 考察

疾患マーカーの検索のためには症例数を増やす必要があるが、希少疾患であるので難しい。全国規模の調査研究が必要である。FACS 解析を SRL 社に委託し、集積した今回の結果でカットオフ値が決まるので、このシステムを使ってさらに調査研究を進めたいと考えている。また AMED が推進している IRUD との連携を図る必要がある。遺伝子解析から診断をするシステムが複数走り、

診断がついても、その疾患の専門家である政策班に知らされていない。データシェアリングのシステムが早く構築されることを期待している。また連携する AMED 班がなく、疾患モデルや患者由来の iPS 細胞ができていないが、それらを使った基礎研究ができないので新規治療法や診断法の開発について進められていない。今後、採択されるよう努力する。

E . 結論

先天性 GPI 欠損症 (IGD) は新しい疾患であるが最近原因不明の運動発達障害や難治性てんかんの症例の中から次々と見つかっている。末梢血のフローサイトメトリーでスクリーニングが可能であり、遺伝子解析で変異遺伝子を同定し、機能解析で確認できる系がある。またビタミン B₆ (ピリドキシン) の投与がけいれん発作に著効する症例がある。早期診断・早期治療を実現する為にベッドサイドでの鋭敏な疾患マーカーの検索と、新たな治療法の開発が重要である。

F . 健康危険情報

特記すべきことなし

G . 研究発表

1. 論文発表

- Pagnamenta AT, Murakami Y, Taylor JM, Anzilotti C, Howard MF, Miller V, Johnson DS, Tadros S, Mansour S, Temple IK, Firth R, Rosser E, Harrison RE, Kerr B, Popitsch N; DDD Study, Kinoshita T, Taylor JC, Kini U. Analysis of exome data for 4293 trios suggests GPI-anchor biogenesis defects are a rare cause of developmental disorders. Eur J Hum Genet. 2017 Jun;25(6):669-679.
- Johnstone DL, Nguyen TT, Murakami Y, Kernohan KD, Tétreault M, Goldsmith C, Doja A, Wagner JD, Huang L, Hartley T, St-Denis A, le Deist F,

- Majewski J, Bulman DE; Care4Rare Canada Consortium, Kinoshita T, Dyment DA, Boycott KM, Campeau PM. Compound heterozygous mutations in the gene PIGP are associated with early infantile epileptic encephalopathy. *Hum Mol Genet.* 2017 May 1;26(9):1706-1715.
- Tanigawa J, Mimatsu H, Mizuno S, Okamoto N, Fukushi D, Tominaga K, Kidokoro H, Muramatsu Y, Nishi E, Nakamura S, Motooka D, Nomura N, Hayasaka K, Niihori T, Aoki Y, Nabatame S, Hayakawa M, Natsume J, Ozono K, Kinoshita T, Wakamatsu N, Murakami Y. Phenotype-genotype correlations of PIGO deficiency with variable phenotypes from infantile lethality to mild learning difficulties. *Hum Mutat.* 2017 Jul;38(7):805-815..
 - Kohashi K, Ishiyama A, Yuasa S, Tanaka T, Miya K, Adachi Y, Sato N, Saitsu H, Ohba C, Matsumoto N, Murakami Y, Kinoshita T, Sugai K, Sasaki M. Epileptic apnea in a patient with inherited glycosylphosphatidylinositol anchor deficiency and PIGT mutations. *Brain Dev.* 2018 Jan;40(1):53-57.
 - Nguyen TTM, Murakami Y, Sheridan E, Ehresmann S, Rousseau J, St-Denis A, Chai G, Ajeawung NF, Fairbrother L, Reimschisel T, Bateman A, Berry-Kravis E, Xia F, Tardif J, Parry DA, Logan CV, Diggle C, Bennett CP, Hattingh L, Rosenfeld JA, Perry MS, Parker MJ, Le Deist F, Zaki MS, Ignatius E, Isohanni P, Lönnqvist T, Carroll CJ, Johnson CA, Gleeson JG, Kinoshita T, Campeau PM. Mutations in GPAA1, Encoding a GPI Transamidase Complex Protein, Cause Developmental Delay, Epilepsy, Cerebellar Atrophy, and Osteopenia. *Am J Hum Genet.* 2017 Nov 2;101(5):856-865.
 - Liu YS, Guo XY, Hirata T, Rong Y, Motooka D, Kitajima T, Murakami Y, Gao XD, Nakamura S, Kinoshita T, Fujita M. N-Glycan-dependent protein folding and endoplasmic reticulum retention regulate GPI-anchor processing. *J Cell Biol.* 2018 Feb 5;217(2):585-599.
 - Hirata T, Mishra SK, Nakamura S, Saito K, Motooka D, Takada Y, Kanzawa N, Murakami Y, Maeda Y, Fujita M, Yamaguchi Y, Kinoshita T. Identification of a Golgi GPI-N-acetylgalactosamine transferase with tandem transmembrane regions in the catalytic domain. *Nat Commun.* 2018 Jan 26;9(1):405.
 - Mogami Y, Suzuki Y, Murakami Y, Ikeda T, Kimura S, Yanagihara K, Okamoto N, Kinoshita T. Early infancy-onset stimulation-induced myoclonic seizures in three siblings with inherited glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor deficiency. *Epileptic Disord.* 2018 Feb 1;20(1):42-50.
 - Pagnamenta AT, Murakami Y, Anzilotti C, Titheradge H, Oates AJ, Morton J; DDD Study, Kinoshita T, Kini U, Taylor JC. A homozygous variant disrupting the PIGH start-codon is associated with developmental delay, epilepsy, and

microcephaly. Hum Mutat. 2018 Mar 23. doi: 10.1002/humu.23420. [Epub ahead of print].

2. 学会発表

- A CRISPR forward genetic screen for GPI-GalNAc-galactosyltransferase
王 宜成、平田哲也、村上良子、前田裕輔、木下タロウ
第 18 回 関西グライコサイエンスフォーラム 2017-5-13 国内
- 新規の先天性 GPI 欠損症、PIGB 欠損症について 村上良子、亀井 淳、宮武聡子、赤坂真奈美、輿水江里子、荒谷菜摘、水無瀬 学、松本直通、木下タロウ
第 59 回日本小児神経学会学術集会 2017-6-15~17 日 1 国内
- B3GALT4 は GPI アンカー側鎖のガラクトースをも転移する 王宜成、平田哲也、村上良子、前田裕輔、木下タロウ
第 36 回日本糖質学会年会 2017-7-19~21 旭川市民文化会館 国内
- PGAP4 の糖転移酵素ドメインに挿入された二つの膜貫通領域は糖脂質 GPI の認識に関与しうる 平田哲也、Sushil Kumar Mishra、中村昇太、齋藤一伸、元岡大祐、高田洋子、神澤範之、村上良子、前田裕輔、藤田盛久、山口芳樹、木下タロウ
第 36 回日本糖質学会年会 2017-7-19~21 国内
- PGAP6 による GPI アンカー型タンパク質の選択的切断に関する認識領域の解析
イゴンヒ、藤田盛久、中西秀樹、村上良子、前田裕輔、木下タロウ
第 36 回日本糖質学会年会 2017-7-19~21 旭川市民文化会館 国内
- PIGT-PNH 患者における自己炎症メカニズムの解明
その 1 患者検体からの検討

村田祥吾、村上良子、大里幸真子、植田康敬、西村純一、井上徳光、川本未知、幸原伸夫、木下タロウ

第 54 回日本補体学会学術集会
1017-9-1~2 国内

- PIGT-PNH 患者における自己炎症メカニズムの解明
その 2 ヒト単球細胞株での解析
大里幸真子、村上良子、村田祥吾、植田康敬、西村純一、金倉 譲、木下タロウ
第 54 回日本補体学会学術集会 1017-9-1~2 国内
- B3GALT4 はグリコシルホスファチジルイノシトールの側鎖にガラクトースを転移する
王 宜成、平田 哲也、村上 良子、前田 裕輔、木下 タロウ
生命科学系学会合同年次会 (ConBio2017) 2017-12-6~9 国内
- Inherited GPI deficiency: our recent progress Yoshiko Murakami, Y. Shimmyo, T. Sunabori, Y. Yoshioka, M. Koike and Taroh Kinoshita,
2018 SBP Rare Disease Day Symposium CDG Family Conference February 23-25 2018 San Diego CA 海外

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
該当無し